

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2001 年12 月27 日 (27.12.2001)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 01/98472 A1

(51) 国際特許分類: C12N 9/04, 15/53, 15/63,
1/21, C12P 13/04 // (C12N 9/04, C12R 1:15) (C12N 1/21,
C12R 1:19) (C12N 1/21, C12R 1:15)

(21) 国際出願番号: PCT/JP01/05113

(22) 国際出願日: 2001 年6 月15 日 (15.06.2001)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:
特願2000-185789 2000 年6 月21 日 (21.06.2000) JP

(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 協和醗酵
工業株式会社 (KYOWA HAKKO KOGYO CO., LTD.)
[JP/JP]; 〒100-8185 東京都千代田区大手町一丁目6番
1号 Tokyo (JP).

(72) 発明者; および

(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 横井治彦 (YOKOI,

Haruhiko) [JP/JP]. 安藤聖子 (ANDO, Seiko) [JP/JP]. 落
合恵子 (OCHIAI, Keiko) [JP/JP]. 米谷良之 (YONE-
TANI, Yoshiyuki) [JP/JP]; 〒194-8533 東京都町田市旭
町3丁目6番6号 協和醗酵工業株式会社 東京研究所内
Tokyo (JP). 橋本信一 (HASHIMOTO, Shin-ichi) [JP/JP];
〒747-8522 山口県防府市協和町1番1号 協和醗酵工
業株式会社 技術研究所内 Yamaguchi (JP).

(81) 指定国 (国内): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB,
BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK,
DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU,
ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT,
LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ,
PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT,
TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

(84) 指定国 (広域): ARIPO 特許 (GH, GM, KE, LS, MW,
MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), ユーラシア特許 (AM,
AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ特許
(AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT,
LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI 特許 (BF, BJ, CF, CG,
CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

[続表有]

(54) Title: NOVEL GLUCOSE-6-PHOSPHATE DEHYDROGENASE

(54) 発明の名称: 新規なグルコース-6-リン酸デヒドロゲナーゼ

(57) Abstract: A novel glucose-6-phosphate dehydrogenase (hereinafter referred to simply as G6PD) originating in a corynebacterium; a DNA encoding this enzyme; a recombinant DNA containing the above DNA; a transformant carrying the above recombinant DNA; a transformant having the above DNA on the chromosome; and a process for producing an L-amino acid or G6PD characterized by culturing the above transformant. Thus, a modified G6PD and a DNA encoding this G6PDH can be obtained. Use of this modified G6PD makes it possible to elevate the productivity of an L-amino acid by a microorganism.

(57) 要約:

本発明はコリネバクテリウム属細菌由来の新規なグルコース-6-リン酸デヒドロゲナーゼ (以下、G6PDと略す)、該酵素をコードするDNA、該DNAを含有する組換え体DNA、該組換えDNAを保有する形質転換体、該DNAを染色体上に有する形質転換体、及び該形質転換体を培養することを特徴とするL-アミノ酸またはG6PDの製造法に関する。

本発明により、改変されたG6PDおよび該G6PDHをコードするDNAが得られ、該改変されたG6PDを用いて、微生物によるL-アミノ酸の生産性を向上させることができる。



添付公開書類:

— 国際調査報告書

— 明細書とは別に規則 13 の 2 に基づいて提出された
生物材料の寄託に関する表示。

2 文字コード及び他の略語については、定期発行される
各 *PCT* ガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語
のガイダンスノート」を参照。

明 細 書

新規なグルコース－6－リン酸デヒドロゲナーゼ

技術分野

本発明はコリネバクテリウム(*Corynebacterium*)属細菌由来の新規なグルコース－6－リン酸デヒドロゲナーゼ(以下、G 6 P Dと略す)、該酵素をコードするDNA、該DNAを含有する組換え体DNA、該組換え体DNAを保有する形質転換体、該DNAを染色体上に有する形質転換体、及びこれらの形質転換体を培養することを特徴とするL－アミノ酸の製造法に関する。

背景技術

アミノ酸を効率よく生産する菌株を得るためには、その細菌における該アミノ酸の生合成に関わる遺伝子の性質およびそれらの発現・活性制御様式を知り、それに基づく合理的な育種を行うことが重要である。

アミノ酸生産に関わる遺伝子の機能を理解するための重要な方法の一つは、遺伝学的な手法、例えばアミノ酸生産性の上昇あるいは減少と遺伝子変異との関係を明らかにすることである。

アミノ酸生産菌の育種の多くは、アミノ酸アナログなどの薬剤に対する耐性変異の付与により行われているが、多くの場合、生産性向上がどの遺伝子の変異によってもたらされているかは明らかでない。

多くの微生物のアミノ酸生合成には、還元反応時の補酵素としてNADPHが必要である。例えば、1分子のL－リジン生合成には4分子のNADPHが必要となる。同様に、スレオニンでは1分子あたり3分子、イソロイシンでは1分子あたり5分子のNADPHが必要となるなど、大部分のアミノ酸の生合成には分子あたり複数のNADPHを必要とする。従って、微生物を用いたこれらのアミノ酸の生産にとって、NADPHの供給は重要な課題である。

多くの微生物では、NADPHの供給酵素は限定される。該微生物の糖代謝の主要経路上でNADPHを供給できるのは、主にペントースリン酸経路(HMP)中

のG 6 P D [EC1.1.1.49]、6-ホスホグルコン酸デヒドロゲナーゼ [EC1.1.1.4]、およびT C A回路中のイソクエン酸デヒドロゲナーゼ [EC1.1.1.41]と考えられている。

なかでもHMPの第一酵素であり、エムデン・マイヤーホフ経路 (EMP) との分岐点酵素でもあるG 6 P Dはエシェリヒア (*Escherichia*) 属やコリネバクテリウム属細菌による種々のアミノ酸の生産にとって非常に重要な酵素と考えられ、生化学的諸性質を中心に様々な解析が行われてきた。コリネバクテリウム属細菌の該酵素については、例えば、*Journal of Bacteriology*, 98, 1151, (1969); *Agricultural and Biological Chemistry*, 51, 101, (1987)、特開平9-224661に報告されているが、該酵素を利用したアミノ酸の生産性向上に関する検討は報告されていない。

また、大腸菌、およびコリネバクテリウム・グルタミカム (*Corynebacterium glutamicum*) などの細菌については、該遺伝子の塩基配列が解明されている

(*Journal of Bacteriology*, 173, 968, (1991); 特開平9-224661) が、該遺伝子を利用したアミノ酸の生産性向上に関する検討は報告されていない。

発明の開示

本発明の目的は、L-アミノ酸の生合成に関与するG 6 P D、該酵素をコードするDNA、該DNAをベクターに組み込んで得られる組換え体DNAまたは該組換え体DNAを保有する形質転換体を利用して、微生物によるL-アミノ酸生産性をより高め、工業的に有利にL-アミノ酸を製造することにある。

本発明者は、配列番号2で表されるアミノ酸配列を有するポリペプチドをコードするDNAを単離することに成功し、L-アミノ酸の製造に利用できることを見出した。また、鋭意検討を行った結果、配列番号2で表されるアミノ酸配列において213番目のAlaが別のアミノ酸に置換され、かつG 6 P D活性を有するポリペプチドは、L-アミノ酸の生産性をさらに向上させることを見出し、本発明を完成させるに至った。すなわち、本発明は、以下の(1)～(21)に関する。

(1) 配列番号2で表されるアミノ酸配列を有するポリペプチド。

(2) 配列番号2で表されるアミノ酸配列において、213番目のAlaが別のアミノ酸に置換されたアミノ酸配列を有し、かつG6PD活性を有するポリペプチド。

(3) 配列番号12で表されるアミノ酸配列を有するポリペプチド。

(4) 上記(2)のポリペプチドのアミノ酸配列において、213番目以外の1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつG6PD活性を有するポリペプチド。

(5) 配列番号12で表されるアミノ酸配列において、213番目以外の1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつG6PD活性を有するポリペプチド。

(6) 上記(1)～(5)いずれか1つのポリペプチドをコードするDNA。

(7) 配列番号1で表される塩基配列を有するDNA。

(8) 配列番号1で表される塩基配列において、Alaをコードする第637～639番目の塩基配列が、Ala以外のアミノ酸をコードするコドンに置換された塩基配列を有するDNA。

(9) 配列番号11で表される塩基配列を有するDNA。

(10) 配列番号1で表される塩基配列を有するDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、配列番号1で表される塩基配列においてAlaをコードする第637～639番目の塩基配列に相応する塩基配列がAla以外のアミノ酸をコードするコドンに置換された塩基配列を有し、かつグルコース-6-リン酸デヒドロゲナーゼ活性を有するポリペプチドをコードするDNA。

(11) 配列番号1で表される塩基配列を有するDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、配列番号1において第637番目の塩基に相応する塩基がアデニンである塩基配列を有し、かつG6PD活性を有するポリペプチドをコードするDNA。

(12) 上記(6)～(11)いずれか1つのDNAをベクターに組み込んで得られる組換え体DNA。

(13) 組換え体DNAが、エシェリヒア属またはコリネバクテリウム属に

属する微生物で複製可能な組換え体DNAである、上記(12)の組換え体DNA。

(14) Escherichia coli TOP10 (FERM BP-7135) 株が保有するプラスミド pCRBzwfM。

(15) 上記(12)～(14)いずれか1つの組換え体DNAまたはプラスミドを宿主細胞に導入して得られる形質転換体。

(16) 宿主細胞が、L-アミノ酸を生産する能力を有する微生物である、上記(15)の形質転換体。

(17) 宿主細胞が、エシェリヒア属またはコリネバクテリウム属に属する微生物である、上記(16)の形質転換体。

(18) 上記(6)～(11)いずれか1つのDNAを人為的に染色体上に取り込んだ、エシェリヒア属またはコリネバクテリウム属に属する形質転換体。

(19) コリネバクテリウム属に属する微生物が、コリネバクテリウム・グルタミカムである、上記(17)または(18)の形質転換体。

(20) 上記(15)～(19)いずれか1つの形質転換体を培地に培養し、培養物中に上記(1)～(5)いずれか1つのポリペプチドを生成蓄積させ、該培養物から該ポリペプチドを採取することを特徴とする、ポリペプチドの製造方法。

(21) 上記(16)～(19)いずれか1つの形質転換体を培地に培養し、培養物中にNADPHを利用して生合成されるL-アミノ酸を生成蓄積させ、該培養物から該L-アミノ酸を採取することを特徴とする、L-アミノ酸の製造方法。

(22) NADPHを利用して生合成されるL-アミノ酸が、L-リジン、L-スレオニン、L-イソロイシン、L-トリプトファン、L-フェニルアラニン、L-チロシン、L-ヒスチジン、L-システインから選ばれるL-アミノ酸である、上記(21)のL-アミノ酸の製造方法。

(23) L-アミノ酸がL-リジンである、上記(21)のL-アミノ酸の製造方法。

以下、本発明についてさらに詳細に説明する。

本発明のポリペプチドは、配列番号2で表されるアミノ酸配列を有するポリペプチドまたは配列番号2で表されるアミノ酸配列の213番目のA1aが別のアミ

ノ酸に置換されたアミノ酸配列を有し、かつG 6 P D活性を有するポリペプチドである。該ポリペプチドとしては、例えば配列番号1 2で表されるアミノ酸配列を有するポリペプチドがあげられる。

G 6 P D活性を有していれば、上記ポリペプチドが有するアミノ酸配列において、1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列を有するポリペプチドも本発明のポリペプチドに包含される。ただし、該ポリペプチドは公知のG 6 P D (例えば、配列番号2において、1 2 0番目のThrがAlaに置換されたポリペプチド) を含まない。

該1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換または付加されたアミノ酸配列からなり、かつG 6 P D活性を有する蛋白質は、Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989) (以下、モレキュラー・クローニング第2版と略す)、Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons (1987-1997) (以下、カレント・プロトコールズ・イン・モレキュラー・バイオロジーと略す)、Nucleic Acids Research, 10, 6487 (1982)、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 79, 6409 (1982)、Gene, 34, 315 (1985)、Nucleic Acids Research, 13, 4431 (1985)、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82, 488 (1985)等に記載の部位特異的変異導入法を用いて、例えば配列番号2または1 2で示されるアミノ酸配列を有するポリペプチドをコードするDNAに部位特異的変異を導入することにより、取得することができる。また、配列番号2で表されるアミノ酸配列から1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換または付加された配列をもともと有し、かつG 6 P D活性を有するポリペプチド (例えばコリネバクテリウム・グルタミクムと近縁の微生物由来のG 6 P D) をコードするDNAに上記方法により部位特異的変異を導入し、配列番号2で表されるアミノ酸配列の2 1 3番目のアミノ酸に相応するアミノ酸を別のアミノ酸に置換することによっても取得することができる。

欠失、置換もしくは付加されるアミノ酸の数は特に限定されないが、上記の部位特異的変異法等の周知の方法により欠失、置換もしくは付加できる程度の数であり、好ましくは1~10個、さらに好ましくは1~5個である。

また、本発明のポリペプチドがG 6 P D活性を有するためには、配列番号2また

は12記載のアミノ酸配列と、BLAST〔J. Mol. Biol., 215, 403 (1990)〕やFASTA〔Methods in Enzymology, 183, 63-98 (1990)〕等を用いて計算したときに少なくとも60%以上、通常は80%以上、特に95%以上の相同性を有していることが好ましい。

本発明のポリペプチドをコードする本発明のDNAとしては、例えば、配列番号1で表される塩基配列を有するDNA、配列番号1で表される塩基配列においてAlaをコードする第637～639番目の塩基配列がAla以外のアミノ酸をコードするコドンに置換された塩基配列（以下、配列番号1subと略す）を有するDNA、または配列番号1において、第637番目の塩基がアデニンである塩基配列を有するDNAである配列番号11で表される塩基配列を有するDNAがあげられる。

配列番号1で表される塩基配列を有するDNAとストリンジントな条件下でハイブリダイズし、配列番号1で表される塩基配列においてAlaをコードする第637～639番目の塩基配列に相応する塩基配列がAla以外のアミノ酸をコードするコドンに置換された塩基配列を有し、かつG6PD活性を有するポリペプチドをコードするDNAも本発明のDNAに包含される。ただし、該DNAには公知のDNA（例えば、配列番号1において、358番目のアデニンがグアニンに置換されたDNA）は含まれない。

ここで、配列番号1のDNAとストリンジントな条件下でハイブリダイズ可能なDNAとは、配列番号1または配列番号11で表される塩基配列を有するDNAをプローブとして、コロニー・ハイブリダイゼーション法、ブランク・ハイブリダイゼーション法あるいはサザンブロットハイブリダイゼーション法等を用いることにより得られるDNAを意味し、具体的には、コロニーあるいはブランク由来のDNAを固定化したフィルターを用いて、0.7～1.0mol/lの塩化ナトリウム存在下、65℃でハイブリダイゼーションを行った後、0.1～2倍濃度のSSC溶液（1倍濃度のSSC溶液の組成は、150mmol/l塩化ナトリウム、15mmol/lクエン酸ナトリウムよりなる）を用い、65℃条件下でフィルターを洗浄することにより同定できるDNAをあげることができる。ハイブリダイゼ

ーションは、モレキュラー・クローニング第2版、カレント・プロトコールズ・イン・モレキュラー・バイオロジー、DNA Cloning 1: Core Techniques, A Practical Approach, Second Edition, Oxford University (1995)等に記載されている方法に準じて行うことができる。ハイブリダイズ可能なDNAとして具体的には、前述のBLASTやFASTA等を用いて計算したときに、配列番号1または11で表される塩基配列と少なくとも60%以上の相同性を有する塩基配列を有するDNA、好ましくは80%以上の相同性を有する塩基配列を有するDNA、さらに好ましくは95%以上の相同性を有する塩基配列を有するDNAをあげることができる。

上記本発明のDNAは、Corynebacterium glutamicum No.58(FERM BP-7134)株あるいは該株に通常の変異操作を施した後、L-アミノ酸生産性が高まった変異株から取得することができる。

変異操作としては、例えば、N-メチル-N'-ニトロ-N-ニトロソグアニジン (NTG) を用いた常法；微生物実験マニュアル，1986年，131頁，講談社サイエンティフィック社) をあげることができる。

上記本発明のDNAの単離は、以下の方法により行うことができる。

すなわち、該DNAを含む株より、例えば斎藤らの方法[Biochimica et Biophysica Acta, 72, 619 (1963)]により染色体DNAを調製し、該染色体DNAを適当な制限酵素で切断する。得られたDNA断片を細菌内で自立複製可能なベクター (例えばプラスミド) に連結し、該連結されたDNAをG6PD活性が欠損する微生物に導入する。得られた微生物より、G6PD活性を指標に形質転換株を単離し、該形質転換株より該酵素遺伝子を単離する。

例えば、大腸菌[Escherichia coli]のグルコース-6-リン酸イソメラーゼのみを欠損する株はグルコースを唯一の炭素源とする培地で生育できるが、さらにG6PDを欠損する株はグルコースを唯一の炭素源とした培地で生育できない [Escherichia coli and Salmonella typhimurium, 192 (1996)]。従って、該2重欠損株にDNAを導入し、グルコースを唯一の炭素源とした培地で生育できるようになった株を選択することにより、該株より本発明のDNAを単離することができる。

本発明のDNAを導入する微生物は、該DNAが発現可能なものならば、いかなる属の細菌でも使用できる。また、自立複製可能なベクターとは、該細菌内で自立複製できるものならばいかなるものでもよい。例えば、エシェリヒア属に属する微生物、なかでも大腸菌の場合、該自立複製可能なベクターとしては、pUC18（宝酒造社製）やpBluescriptSK(-)（東洋紡社製）が挙げられる。また、pCE54（特開昭58-105999）のような大腸菌とコリネバクテリウム属細菌の両方で自立複製可能なシャトルベクターでもよい。

該ベクターと本発明のDNAとの連結は、T4DNAリガーゼ等を用いる通常の方法で行なうことができる。宿主への導入は、例えば大腸菌の場合、ハナハンらの方法 [Journal of Molecular Biology, 166, 557 (1983)] 等により行なうことができる。

あるいは、G6PD遺伝子の塩基配列情報 [例えば、コリネバクテリウム・グルタミカムの場合、ジェンバンク (GenBank) アクセッション・ナンバー E13655、あるいは配列番号1で表される塩基配列] をもとにオリゴマーDNAを合成し、該オリゴマーDNAをプライマー、コリネバクテリウム属に属する微生物の染色体DNAを鋳型としてポリメラーゼ・チェーン・リアクション (PCR) を行い、得られたDNA断片を選択マーカー遺伝子を有するベクターに連結してエシェリヒア属、コリネバクテリウム属細菌等の適当な宿主に導入し、該遺伝子を単離することもできる。この場合はG6PD欠損株を用いる必要はない。

さらには、該遺伝子の塩基配列、例えば配列番号1で表される塩基配列をもとに、通常用いられるDNA合成装置、例えばパーキンエルマー社製ABI3948を用いて合成することもできる。

上記方法により単離された本発明のDNAを、宿主微生物で複製および発現が可能な発現ベクターに導入し、得られた組換え体ベクターにより宿主微生物を形質転換する。

本発明のポリペプチドをコードするDNAを含有してなる組換え体DNAは微生物中で自立複製可能であると同時に、プロモーター、リボソーム結合配列、本発明のDNA、転写終結配列、より構成されたベクターであることが好ましい。プロ

モーターを制御する遺伝子が含まれていてもよい。

この目的のためのベクターとしては、エシェリヒア属に属する微生物の場合、例えば、pBTrp2、pBTac1、pBTac2（いずれもベーリンガーマンハイム社より市販）、pKK233-2（Pharmacia社製）、pSE280（Invitrogen社製）、pGEMEX-1（Promega社製）、pQE-8（QIAGEN社製）、pKYP10（特開昭58-110600）、pKYP200〔Agric. Biol. Chem., 48, 669（1984）〕、pLSA1〔Agric. Biol. Chem., 53, 277（1989）〕、pGEL1〔Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82, 4306（1985）〕、pBluescript II SK(-)（Stratagene社製）、pTrs30〔エシェリヒア・コリJM109/pTrs30（FERM BP-5407）より調製〕、pTrs32〔エシェリヒア・コリJM109/pTrs32（FERM BP-5408）より調製〕、pGHA2〔エシェリヒア・コリ IGHA2（FERM B-400）より調製、特開昭60-221091〕、pGKA2〔エシェリヒア・コリ IGKA2（FERM BP-6798）より調製、特開昭60-221091〕、pTerm2（US4686191、US4939094、US5160735）、pSupex、pUB110、pTP5、pC194、pEG400〔J. Bacteriol., 172, 2392（1990）〕、pGEX（Pharmacia社製）、pETシステム（Novagen社製）等をあげることができる。また、コリネバクテリウム属に属する微生物の場合、pCG1（特開昭57-134500）、pCG2（特開昭58-35197）、pCG4（特開昭57-183799）、pCG11（特開昭57-134500）、pCG116、pCE54、pCB101（いずれも特開昭58-105999）、pCE51、pCE52、pCE53〔いずれもMolecular and General Genetics, 196, 175（1984）〕、および本明細書実施例に示すpCS299P等が挙げられる。

プロモーターとしては、宿主細胞中で機能するものであればいかなるものでもよい。例えば、trpプロモーター（ P_{trp} ）、lacプロモーター、 P_L プロモーター、 P_R プロモーター、T7プロモーター等の、大腸菌やファージ等に由来するプロモーターをあげることができる。また P_{trp} を2つ直列させたプロモーター（ $P_{trp} \times 2$ ）、tacプロモーター、lacT7プロモーター、let Iプロモーターのように人為的に設計改変されたプロモーター等も用いることができる。

リボソーム結合配列であるシャイン・ダルガノ（Shine-Dalgarno）配列と開始コドンとの間を適当な距離（例えば6～18塩基）に調節したプラスミドを用いることが好ましい。

本発明の組換えベクターにおいては、本発明のDNAの発現には転写終結配列は

必ずしも必要ではないが、構造遺伝子の直下に転写終結配列を配置することが好ましい。

宿主細胞としては、下記に示したL-アミノ酸を生産することのできる細胞であればいずれでもよいが、好ましくは該アミノ酸を生産する能力を有する微生物が利用される。より好ましくは、エシェリヒア属またはコリネバクテリウム属に属する微生物が、さらに好ましくはコリネバクテリウム属に属する微生物が、とくに好ましくは、コリネバクテリウム・グルタミカムが利用される。

該微生物の例として、例えば、セラチア(*Serratia*)属、コリネバクテリウム(*Corynebacterium*)属、アースロバクター(*Arthrobacter*)属、ミクロバクテリウム(*Microbacterium*)属、バチルス(*Bacillus*)属、エシェリヒア(*Escherichia*)属に属する微生物をあげることができる。具体的な例としては、エシェリヒア・コリ XL1-Blue、エシェリヒア・コリ XL2-Blue、エシェリヒア・コリ DH1、エシェリヒア・コリ MC1000、エシェリヒア・コリ KY3276、エシェリヒア・コリ W1485、エシェリヒア・コリ JM109、エシェリヒア・コリ HB101、エシェリヒア・コリ No.49、エシェリヒア・コリ W3110、エシェリヒア・コリ NY49、エシェリヒア・コリ GI698、エシェリヒア・コリ TB1、エシェリヒア・コリ ATCC 9637、エシェリヒア・コリ FERM BP-5985、セラチア・フィカリア(*Serratia ficaria*)、セラチア・フォンティコラ(*Serratia fonticola*)、セラチア・リケファシエンシス(*Serratia liquefaciens*)、セラチア・マルセッセンス(*Serratia marcescens*)、バチルス・ズフチリス(*Bacillus subtilis*)、バチルス・アミロリケファシエンシス(*Bacillus amyloliquefaciens*)、コリネバクテリウム・アンモニアゲネス(*Corynebacterium ammoniagenes*) ATCC6872、ブレビバクテリウム・インマリオフィルム(*Brevibacterium immariophilum*) ATCC14068、ブレビバクテリウム・サッカロリテイクム(*Brevibacterium saccharolyticum*) ATCC14066、ブレビバクテリウム・ロゼウム(*Brevibacterium roseum*) ATCC13825、ブレビバクテリウム・チオゲニタリス(*Brevibacterium thiogenitalis*) ATCC19240、コリネバクテリウム・グルタミカム(*Corynebacterium glutamicum*) ATCC14067、コリネバクテリウム・グルタミカム(*Corynebacterium glutamicum*) ATCC13869、コリネバクテリウム・グルタミカム(*Corynebacterium glutamicum*) ATCC13032、コリネバクテリウム・グルタミカム ATCC13869、コリネバクテリウム・グルタミカム(*Corynebacterium glutamicum*) ATCC13870、コリネバクテリウム・カルナエ(*Corynebacterium callunae*) ATCC15991、コリネバクテリウム・アセトグルタミカム(*Corynebacterium acetoglutamicum*) ATCC15806、ミクロバクテリウム・アンモニアフィラム(*Microbacterium ammoniaphilum*) ATCC15354、コリネバクテリウム・サーモアミノゲネス(*Corynebacterium thermoaminogenes*) AJ12340等をあげることができる。好適には、下記の菌株あるいは下記菌株から誘導されたL-アミノ酸生産変異株が利用される。

コリネバクテリウム・グルタミカム ATCC13032

コリネバクテリウム・グルタミカム ATCC13869

コリネバクテリウム・グルタミカム ATCC13870

組換えベクターの導入方法としては、上記宿主細胞へDNAを導入する方法であればいずれも用いることができる。例えば、エシェリヒア属に属する微生物の場合、カルシウムイオンを用いる方法 [Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 69, 2110 (1972)] や電気穿孔法 [Methods in Enzymology, 235, 375 (1994)] 等をあげることができる。コリネバクテリウム属に属する微生物の場合、プロトプラスト法 (例えば、特開昭57-186492および特開昭57-18649) や、電気穿孔法 [例えば、[Journal of Bacteriology, 175, 4096 (1993)] を挙げることができる。

本発明のDNAを染色体上に有するエシェリヒア属またはコリネバクテリウム属に属する微生物としては、該DNA断片が遺伝子組換えあるいは変異処理により染色体上に人為的に導入されたものであればいかなるものでもよい。例えば任意の配列のG 6 P D 遺伝子を含む株から変異処理によって本発明のDNAを含む株に改変された株でもよいし、あるいは、相同組換え法 [Bio/Technology, 9, 84 (1991); Microbiology, 144, 1863 (1998)]、ファージやトランスポゾンを用いる方法 [Escherichia coli and Salmonella typhimurium, 2325-2339 (1996)] など、で該DNA断片が染色体内に人為的に挿入された株でもよい。好適には、相同組み換え法により該DNAが染色体中に挿入された株があげられる。

本発明においては、遺伝子組換えに加え、変異処理により得られた株も形質転換体と呼ぶ。

以上のようにして得られる本発明の形質転換体を培地に培養し、培養物中に本発明のポリペプチドを生成蓄積させ、該培養物から採取することにより、本発明のポリペプチドを製造することができる。

また、本発明の形質転換体を培地に培養し、培養物中にL-アミノ酸を生成蓄積させ、該培養物から採取することにより、L-アミノ酸を製造することができる。

該L-アミノ酸としては、生合成にNADPHを使用するアミノ酸であればいずれでもよい。例えば、L-リジン、L-スレオニン、L-イソロイシン、L-トリ

プトファン、L-フェニルアラニン、L-チロシン、L-ヒスチジン、L-システインなどが挙げられる。あるいは、これらアミノ酸を中間体とするアミノ酸以外の化合物でもよい。好適にはL-リジンが挙げられる。第1図にアミノ酸の生合成経路を示した。図中、NADPHを消費する反応を下線とともに示した。

本発明の形質転換体を培地に培養する方法は、宿主の培養に用いられる通常の方法に従って行うことができる。

培養に使用する培地は、炭素源、窒素源、無機塩類などを含む通常の栄養培地を用いることができる。

炭素源としては、本発明の形質転換体もしくは微生物が資化し得るものであればよく、グルコース、フラクトース、スクロース、これらを含む糖蜜、デンプンあるいはデンプン加水分解物等の炭水化物、酢酸、プロピオン酸等の有機酸、エタノール、プロパノールなどのアルコール類等を用いることができる。

窒素源としては、アンモニア、塩化アンモニウム、硫酸アンモニウム、酢酸アンモニウム、リン酸アンモニウム等の無機酸もしくは有機酸のアンモニウム塩、その他の含窒素化合物、ならびに、ペプトン、肉エキス、酵母エキス、コーンスチープリカー、カゼイン加水分解物、大豆粕および大豆粕加水分解物、各種発酵菌体およびその消化物等を用いることができる。

無機塩としては、リン酸第一カリウム、リン酸第二カリウム、リン酸マグネシウム、硫酸マグネシウム、塩化ナトリウム、硫酸第一鉄、硫酸マンガン、硫酸銅、炭酸カルシウム等を用いることができる。

培養は、振盪培養または深部通気攪拌培養などの好氣的条件下で行う。培養温度は15～40℃がよく、培養時間は、通常16時間～7日間である。培養中のpHは3.0～9.0に保持することが好ましい。pHの調整は、無機または有機の酸、アルカリ溶液、尿素、炭酸カルシウム、アンモニアなどを用いて行う。

また、培養中に必要に応じて、アンピシリンやテトラサイクリン等の抗生物質を培地に添加してもよい。

プロモーターとして誘導性のプロモーターを用いた組換えベクターで形質転換した微生物を培養するときには、必要に応じてインデューサーを培地に添加しても

よい。例えば、lacプロモーターを用いた組換えベクターで形質転換した微生物を培養するときにはイソプロピルーβ-D-チオガラクトピラノシド等を、trpプロモーターを用いた組換えベクターで形質転換した微生物を培養するときにはインドールアクリル酸等を培地に添加してもよい。

培養終了後、培養液から菌体などの沈殿物を除去し、イオン交換処理法、濃縮法、塩析法などを併用することにより、培養液からL-アミノ酸を回収することができる。

本発明の形質転換体により製造されたポリペプチドを単離精製するためには、通常の酵素の単離精製法を用いることができる。例えば本発明のポリペプチドが、細胞内に溶解状態で発現した場合には、培養終了後、細胞を遠心分離により回収し、水系緩衝液にけん濁後、超音波破碎機、フレンチプレス、マントンガウリンホモゲナイザー、ダイノミル等により細胞を破碎し、無細胞抽出液を得る。該無細胞抽出液を遠心分離することにより得られる上清から、通常の酵素の単離精製法、即ち、溶媒抽出法、硫酸等による塩析法、脱塩法、有機溶媒による沈殿法、ジエチルアミノエチル (DEAE) -セファロース、DIAION HPA-75 (三菱化成社製) 等のレジンを用いた陰イオン交換クロマトグラフィー法、S-Sepharose FF (Pharmacia社製) 等のレジンを用いた陽イオン交換クロマトグラフィー法、ブチルセファロース、フェニルセファロース等のレジンを用いた疎水性クロマトグラフィー法、分子篩を用いたゲルろ過法、アフィニティークロマトグラフィー法、クロマトフォーカシング法、等電点電気泳動等の電気泳動法等の手法を単独あるいは組み合わせて用い、精製標品を得ることができる。

また、該ポリペプチドが細胞内に不溶体を形成して発現した場合は、同様に細胞を回収後、破碎し、遠心分離を行うことにより、沈殿画分としてポリペプチドの不溶体を回収する。回収したポリペプチドの不溶体を蛋白質変性剤で可溶化する。該可溶化液を希釈または透析し、該可溶化液中の蛋白質変性剤の濃度を下げることにより、該ポリペプチドを正常な立体構造に戻す。該操作の後、上記と同様の単離精製法により該ポリペプチドの精製標品を得ることができる。

本発明のポリペプチドが細胞外に分泌された場合には、培養上清に該ポリペプチ

ドを回収することができる。即ち、該培養物を上記と同様の遠心分離等の手法により処理することにより培養上清を取得し、該培養上清から、上記と同様の単離精製法を用いることにより、精製標品を得ることができる。

このようにして取得されるポリペプチドとして、例えば、配列番号2または12で表されるアミノ酸配列を有するポリペプチドをあげることができる。

また、本発明のポリペプチドは、Fmoc法（フルオレニルメチルオキシカルボニル法）、tBoc法（tert-ブチルオキシカルボニル法）等の化学合成法によっても製造することができる。また、Advanced ChemTech社、パーキン・エルマー社、Pharmacia社、Protein Technology Instrument社、Synthecell-Vega社、PerSeptive社、島津製作所等のペプチド合成機を利用して化学合成することもできる。

以下に本発明の実施例を示すが、本発明はこれらの実施例に限定されるものではない。

図面の簡単な説明

第1図は、蛋白質を構成する20種アミノ酸のコリネバクテリウム属細菌における生合成経路を示した図である。下線を記した箇所はNADPHを消費する反応を示す。枠囲みの箇所はNADPHを生産する反応を示す。

各反応を司る酵素に対応する遺伝子名は、基本的に大腸菌の命名法によった。図中、グルコース-6-リン酸デヒドロゲナーゼはG6PD(zwf)と表した。

第2図は、pCS299Pの造成過程を示した図である。

発明を実施するための最良の形態

実施例1 新規G6PD遺伝子の取得

(1) G6PD遺伝子の塩基配列決定

コリネバクテリウム・グルタミカムNo. 58株（以下、No. 58株と略す）は、コリネバクテリウム・グルタミカムATCC13032株（以下、ATCC13032株と略す）に変異処理を施して得られたL-リジン生産菌である。

該菌株は、独立行政法人 産業技術総合研究所 特許生物寄託センター：日本国茨城

県つくば市東1丁目1番地1中央第6（旧：工業技術院生命工学工業技術研究所：日本国茨城県つくば市東1丁目1番3号）に平成12年4月14日付けで受託番号：FERM BP-7134として寄託されている。ATCC13032株およびNo. 58株のG6PD遺伝子を以下のようにクローニングした。

それぞれの株より、斎藤らの方法 [Biochimica et Biophysica Acta, 72, 619 (1963)] により染色体DNAを調製した。また、コリネバクテリウム・グルタミカムMJ233株において既知となっているG6PD遺伝子の塩基配列 [ジェンバンク (GenBank) アクセッション・ナンバー E13655] をもとにして、該塩基配列を標的とするPCR反応のためのプライマーを常法により作成した。配列番号3、4に該プライマーの塩基配列を示す。PCR反応はパーキンエルマー社製サーマルサイクラー（ジーンアンプPCRシステム 9600）、Pfu turbo DNAポリメラーゼ（ストラタジーン社製）、各染色体DNA100 ng、及び添付のバッファーを用いて、94℃-1分間、60℃-1分間、74℃-2分間のサイクルを25回行った。増幅した約2.2 kbのPCR産物をアガロースゲル電気泳動し、QIAquick Gel Extraction Kit（キアゲン社製）を用いて抽出精製した。

G6PD遺伝子を含む上記2.2 kbのDNA断片とpCR-Bluntベクター（インヴィトロジェン社製）とをT4 DNAリガーゼ（宝酒造社製）を用いて連結した後、常法に従って大腸菌One Shot TOP10 competent cells（インヴィトロジェン社製）に形質転換した。50 µg/mlのカナマイシンを含むLB寒天培地 [酵母エキス（ディフコ社製）5g、バクトトリプトン（ディフコ社製）10g、塩化ナトリウム10g、アガー（ディフコ社製）16gを水1Lに含みpH7.2に調整された培地] 上にて選択した形質転換株を、50 µg/mlのカナマイシンを含むLB培地中で終夜培養し、得られた培養液からアルカリSDS法（モレキュラー・クローニング第2版）にてプラスミドを調製した。

ATCC13032株由来のG6PD遺伝子を含むプラスミドをpCRBzwf1、No. 58株由来のG6PD遺伝子を含むプラスミドをpCRBzwf2と命名した。

次に、これらプラスミド上のG6PD遺伝子の塩基配列を常法により決定した。その結果、ATCC13032株およびNo. 58株から得られたG6PD遺伝子

の塩基配列は全く同じであることが判明した。該塩基配列を配列番号1に示す。すなわち、L-リジン生産菌No. 58株のG6PD遺伝子は野生型であることが示された。

(2) 新規G6PD遺伝子の取得

No. 58株にNTGによる変異処理(微生物実験マニュアル, 1986年, 131頁、講談社サイエンティフィック社)を施した後、1mg/mlの6-アザウラシルを含む最少寒天培地[グルコース10g、塩化アンモニウム4g、尿素2g、リン酸二水素一カリウム1g、リン酸一水素二カリウム3g、硫酸第一鉄7水和物10mg、硫酸マグネシウム7水和物0.4g、硫酸マンガン7水和物4mg、塩化亜鉛7水和物40 μ g、塩化第二鉄6水和物200 μ g、塩化銅2水和物10 μ g、塩化マンガン4水和物10 μ g、四ほう酸ナトリウム10水和物10 μ g、モリブデン酸アンモニウム4水和物10 μ g、ビオチン50 μ g、ニコチン酸5mg、アガー(ディフコ社製)16gを水1Lに含み、pH7.2に調整された培地]に播種し、30℃で2日間培養した。出現したコロニーを単離し、下記実施例2(4)で示した方法でL-リジンの生産試験を行い、No. 58株に比べて生産性の高いクローンを選定した。そのうちの1株をM1株と命名した。M1株のG6PD遺伝子を上記(1)の方法により単離し、該遺伝子をpCR-Bluntベクターに組み込んだ。得られた組み換えプラスミドをpCRBzwfMと命名した。その塩基配列決定を行ったところ、ATCC13032株およびNo. 58株中のG6PD遺伝子では配列番号1の637番目の塩基がグアニンだが、M1株中のG6PD遺伝子ではアデニンに変化していた。該塩基配列を配列番号11に示した。

該変異により、ATCC13032株およびNo. 58株中のG6PDのアミノ末端側より213番目のAla(コドンGCT)が、M1株のG6PDではThr(コドンACT)に変化していた。該アミノ酸配列を配列番号12に示した。

即ち、M1株のG6PDにはAla213Thrのアミノ酸置換変異が存在することが示された。pCRBzwfMを保有する大腸菌TOP10株は、独立行政法人 産業技術総合研究所 特許生物寄託センター：日本国茨城県つくば市東1丁目1番地1中央第6(旧：工業技術院生命工学工業技術研究所：日本国茨城県つくば市東1丁目1番3

号)に平成12年4月14日付けで受託番号:FERM BP-7135として寄託されている。

実施例2 新規G6PD遺伝子のL-リジン生産に与える効果

(1) 遺伝子置換用ベクターの作成

実施例1で示されたG6PDのアミノ酸置換変異の効果を調べるため、No. 58株のG6PD遺伝子を変異型に置き換えることを試みた。

そのための遺伝子置換用ベクターを以下のように作製した。

配列番号5と6で表される塩基配列を有するそれぞれ37mer、29merの一本鎖DNAを常法に従い合成した。0.1M NaCl 50 μ l中にそれぞれ10pmole/ μ lとなるように混合し、95 $^{\circ}$ Cで2分間保持した後、65 $^{\circ}$ Cで15分間保持した。3時間かけて30 $^{\circ}$ Cまで冷却し、両一本鎖DNAを対合させて2本鎖DNAを得た。

pHSG299 (宝酒造社製)をEcoRI及びSphI (いずれも宝酒造社製)で切断し、アガロースゲル電気泳動を行った後、QIAquick Gel Extraction Kit (キアゲン社製)を用いて抽出精製した。得られたpHSG299断片と上記2本鎖DNA断片をライゲーションキットver2 (宝酒造社製)を用いて連結し、常法に従い大腸菌DH5 α 株を形質転換した。該菌株を50 μ g/mlのカナマイシンを含むLB寒天培地上で培養し、形質転換株を選択した。該形質転換株のうちの1株を50 μ g/mlのカナマイシンを含むLB培地を用いて終夜培養し、得られた培養液からアルカリSDS法にてプラスミドを調製した。得られたプラスミドをpHSG299Lと命名した。

(2) プラスミドpCS299Pの造成

大腸菌とコリネ型細菌双方で自立複製可能なシャトルプラスミドpCS299Pを以下の方法で作製した。

pCG116 [Bio/Technology, 11, 921 (1993)]をBglII (宝酒造社製)で切断し、BglII切断断片を取得した。

pHSG299 (宝酒造社製)をBamHI (宝酒造社製)で切断後、得られたBamHI切断断片を常法にしたがってエタノール沈殿法により濃縮し、該断片をアルカリフォスファターゼで処理した。得られた上記2種類の断片を混合し、ライゲーション

オンキットver. 1 (宝酒造社製) を用い、リガーゼ反応を行った。反応産物を用い、常法 (モレキュラー・クローニング第2版) に従って大腸菌NM522株を形質転換した。該菌株を、 $20\mu\text{g}/\text{ml}$ のカナマイシンを含むLB寒天培地上で培養し、形質転換株を選択した。該形質転換株を $20\mu\text{g}/\text{ml}$ のカナマイシンを含むLB培地を用い終夜培養し、得られた培養液からアルカリSDS法によりプラスミドを調製し、pCS116-299Bgl1 DNAを取得した。

該pCS116-299Bgl1 DNAの制限酵素切断部位を常法に従って確認した。

pCS116-299Bgl1 DNAを用いて電気穿孔法 [FEMS Microbiology Letters, 65, 299, (1989)] によりコリネバクテリウム・アンモニアゲネス ATCC 6872株を形質転換した。

該菌株を $20\mu\text{g}/\text{ml}$ のカナマイシンを含むCM寒天培地 [ポリペプトンS (日本製薬社製) 10g、酵母エキスS (日本製薬社製) 5g、エルリッヒ肉エキス (極東製薬工業社製) 10g、塩化ナトリウム 3g、ビオチン $30\mu\text{g}$ を水1Lに含み、pH7.2に調整された培地] 上で培養し、形質転換株を選択した。該形質転換株より常法に従ってプラスミドを抽出し、該プラスミドを制限酵素で切断することにより、該プラスミドがpCS116-299Bgl1であることを確認した。

pCS116-299Bgl1 DNAを、PstI (宝酒造社製) およびBamHIで切断した後、エタノール沈殿法により精製した。得られたDNAからキロシーケンシング用デリーションキット (宝酒造社製) を用いて部分欠失プラスミドを取得した。該プラスミドを用い、常法に従って大腸菌NM522株を形質転換した。該菌株を $20\mu\text{g}/\text{ml}$ のカナマイシンを含むLB寒天培地上で培養し、形質転換株を選択した。該形質転換株を $20\mu\text{g}/\text{ml}$ のカナマイシンを含むLB培地を用い終夜培養し、得られた培養液からアルカリSDS法にてプラスミドを調製した。常法に従って、得られた各プラスミドの制限酵素地図を作成し、部分欠失長の異なるプラスミドを選択した。

選択したプラスミドを用いて、電気穿孔法によりコリネバクテリウム・アンモニアゲネス ATCC 6872株を形質転換した。得られた形質転換株を $20\mu\text{g}/\text{ml}$ のカナマイシンを含むCM寒天培地上に塗布後、 30°C で2日間培養し、カナマ

イシン耐性コロニーの出現の有無を指標としてコリネバクテリウム・アンモニアゲネス中で自立複製能を有するプラスミドを選択した。

自立複製能を有するプラスミドの中で最も長い欠失領域を有するプラスミドを選択し、このプラスミドをpCS299del6とした。

pCS299del6 DNAを常法に従って形質転換株より調製した後、制限酵素DraIおよびPvuII (いずれも宝酒造社製) を用いて切断した。該切断DNA断片をアガロースゲル電気泳動により分画後、pCG116由来のDNAを有する約2.7 kbのDNA断片を分離し、DNA prep (旭硝子社製) を用いて抽出精製した。

pBluescript SK(+) (東洋紡績社製) DNAを、常法に従ってEcoRV (宝酒造社製) で切断した。得られた切断DNA断片をエタノール沈殿法により濃縮後、アルカリフォスファターゼ処理した。該処理DNA断片をアガロースゲル電気泳動により分画後、DNA prepを用いて抽出精製した。

上記2.7 kbのDNA断片とpBluescript SK(+)断片をライゲーションキット ver. 1を用いて連結した後、該連結DNAを用いて、常法に従って大腸菌NM522株を形質転換した。該菌株を100 μ g/mlのアンピシリン、50 μ g/mlのX-Gal (5-bromo-4-chloro-3-indoyl- β -D-galactoside)、1 mmol/lのIPTG (isopropylthio- β -D-galactoside)を含むLB寒天培地上で培養し、形質転換株を選択した。該形質転換株を100 μ g/mlのアンピシリンを含むLB培地を用い終夜培養し、得られた培養液からアルカリSDS法によりプラスミドを調製した。常法に従って、得られた各プラスミドの制限酵素地図を作成した。EcoRI切断によって3.4 kbと2 kbのDNA断片を生じるプラスミドをpCSSK21とした。

配列番号7、8で表される塩基配列を有するDNAを合成し、これらのDNAをプライマーとして、pHSG299DNAを鋳型として、Taq DNAポリメラーゼ (宝酒造社製) を用い、添付の反応条件に従って、PCR反応を行った。反応産物を常法に従ってエタノール沈殿した後、制限酵素PstIおよびXhoI (宝酒造社製) を用いて切断した。該切断DNA断片をアガロースゲル電気泳動により分画し、得られた約1.3 kbのDNA断片をDNA prepを用いて抽出精製した。

配列番号 9、10 で表される塩基配列を有する DNA を合成し、これらの DNA をプライマーとして、pHSG299 DNA を鋳型として、Taq DNA ポリメラーゼを用い、添付の反応条件に従って、PCR を行った。反応産物を常法に従ってエタノール沈殿した後、制限酵素 Pst I および Bgl II を用いて切断した。該切断 DNA 断片をアガロースゲル電気泳動により分画し、得られた約 1.3 kb の DNA 断片を DNA prep を用いて抽出精製した。

上記で取得したプラスミド pCSSK21 を Sal I (宝酒造社製) および Bam HI を用いて切断した。該切断 DNA 断片をアガロースゲル電気泳動により分画し、得られた約 2.7 kb の DNA 断片を DNA prep を用いて抽出精製した。抽出精製された上記の 3 種類の DNA 断片を混合した後、ライゲーションキット ver. 1 を用いて連結した。

該連結 DNA 断片を用いて常法に従って大腸菌 NM522 株を形質転換した。該菌株を 20 μ g/ml のカナマイシン、50 μ g/ml の X-Gal、1 mmol/l の IPTG を含む LB 寒天培地上で培養し形質転換株を選択した。

該形質転換株を、20 μ g/ml のカナマイシンを含む LB 培地を用い終夜培養し、得られた培養液からアルカリ SDS 法によりプラスミドを調製した。常法に従って、得られた各プラスミドの制限酵素地図を作成し、第 1 図に記載された構造を有するプラスミドを pCS299P とした。

pCS299P 及び pHSG299L を Xba I 及び Pst I (いずれも宝酒造社製) で切断し、アガロースゲル電気泳動を行った。pCS299P に由来するコリネバクテリウム属細菌における複製開始領域 (oriC) を含む 2.5 kb の断片及び pHSG299L 断片をそれぞれ QIAquick Gel Extraction Kit (キアゲン社製) を用いて抽出精製した。該 2.5 kb の DNA 断片と pHSG299L 断片とをライゲーションキット ver. 2 (宝酒造社製) を用いて連結し、常法に従い大腸菌 DH5 α 株に形質転換した。得られた形質転換体から上記方法と同様にプラスミドを調製した。得られたプラスミドを pHSG2990C と命名した。

pMOB3 (ATCC77282) 及び pHSG2990C を Pst I (宝酒造社製) で切断し、アガロースゲル電気泳動を行い、pMOB3 に由来する枯草菌レバンシュークラゼ (SacB)

遺伝子を含む2.6 kbのDNA断片とpHSG2990C断片をそれぞれQIAquick Gel Extraction Kit (キアゲン社製)を用いて抽出精製した。

該2.6 kbのDNA断片とpHSG2990C断片とをライゲーションキットver2 (宝酒造社製)を用いて連結し、常法に従い大腸菌DH5 α 株を形質転換した。該菌株を50 μ g/mlのカナマイシンを含むLB寒天培地上にて培養し、形質転換体を選択した。得られた形質転換体から上記方法と同様にプラスミドを調製した。該プラスミドをpHSG2990CSBと命名した。

pHSG2990CSBをNotIで切断して得られる5.1 kbのDNA断片をアガロースゲル電気泳動後、QIAquick Gel Extraction Kit(キアゲン社製)を用いて抽出精製した。実施例1で作成したpCRBzwfMをNotIで切断し、アガロースゲル電気泳動後、QIAquick Gel Extraction Kit(キアゲン社製)を用いて抽出精製した。ライゲーションキットver2 (宝酒造社製)を用いてpCRBzwfMのNotI部位にOriCおよびSacB遺伝子を含むNotI断片を連結し、常法に従い大腸菌DH5 α 株を形質転換した。該菌株を50 μ g/mlのカナマイシンを含むLB寒天培地で培養し、形質転換株を選択した。得られた形質転換体から上記方法と同様にプラスミドを調製した。該プラスミドをpCRBOSzwfMと命名しこれをG6PD遺伝子組み込みベクターとした。

(3) No. 58株のG6PD遺伝子の置換

No. 58株に変異型G6PD遺伝子を含むpCRBOSzwfMを導入後、池田らの方法 [Microbiology, 144, 1863 (1998)] を用いてこれを相同組み換えで染色体DNA中に組み込んだ。

pCRBOSzwfMにコードされる枯草菌レバンシュークラゼが自殺基質を生産することを利用した選択法 [Journal of Bacteriology, 174, 5462 (1992)] により2度目の相同組み換えが行われた株を選択し、該選択株の中からNo. 58株が従来保有していたG6PD遺伝子(野生型)が変異型G6PD遺伝子に置換された株を以下の方法で単離した。

No. 58株にpCRBOSzwfMを電気穿孔法 [FEMS Microbiology Letters, 65, 299 (1989)] により導入し、50 μ g/mlのカナマイシンを含むKM163寒天培地

〔グルコース 10 g、ペプトン（極東製薬工業社製）10 g、硫酸マグネシウム 0.5 g、エールリッヒ肉エキス（極東製薬工業社製）5 g、尿素 2 g、塩化ナトリウム 2.5 g、バクトアガー（ディフコ社製）18 g を水 1 L に含み pH 7.2 に調整された培地）上にて 30℃ で 2 日間培養し、形質転換株を得た。該形質転換株の 1 株である Tf 1 株を選択し、該菌株を 20 μ g/ml のカナマイシンを含む KM 163 培地中で培養し、電気穿孔法により pCG11（特公平6-91827）の導入操作を行った。導入操作後、該菌株を 50 μ g/ml のカナマイシンおよび 200 μ g/ml のスペクチノマイシンを含む KM 163 寒天培地上にて 30℃ で 2 日間培養し、形質転換体を得た。これらの形質転換株の 1 株の染色体を、池田らの報告 [Microbiology, 144, 1863 (1998)] に従ってサザンブロットハイブリダイゼーションにより調べた。その結果、Campbell タイプの相同組み換えにより pCRBOSzwm が染色体に組み込まれていることが確かめられた。このような株では、野生型および変異型の G6PD 遺伝子が染色体上に近接して存在しており、その間で 2 回目の相同組み換えが起こりやすくなっている。

該形質転換株（一回組換え体）を Suc 培地（ショ糖 100 g、肉エキス 7 g、ペプトン 10 g、塩化ナトリウム 3 g、酵母エキス（ディフコ社製）5 g、バクトアガー（ディフコ社製）18 g を水 1 L に含み pH 7.2 に調整された培地）上に塗布し、30℃ で 1 日間培養して生育するコロニーを選択した。SacB 遺伝子が存在する株は、ショ糖を自殺基質に転換するのでこの培地では生育できない。これに対し、野生型と変異型の G6PD 遺伝子間での 2 回目の相同組み換えにより SacB 遺伝子が欠失した株では、自殺基質はできずこの培地で生育することができる。この相同組み換えの際には、野生型もしくは変異型の G6PD 遺伝子のいずれかが、SacB とともに欠失する。このとき野生型の G6PD 遺伝子が SacB とともに欠失した株では、変異型の G6PD 遺伝子への遺伝子置換が起こったことになる。

このようにして得られた 2 回組換え体の染色体 DNA を斎藤らの方法 [Biochimica et Biophysica Acta, 72, 619 (1963)] により調製し、配列番号 3 と 4 で表される塩基配列を有する DNA をプライマーとして Pfu turbo DNA ポリメラーゼ（ストラタジーン社製）と添付のバッファーを用いて PCR を行った。こ

これらのPCR産物の塩基配列を常法により決定し、2回組み換え体のG6PD遺伝子が野生型か変異型かを判定した。その結果、野生型のG6PD遺伝子のみを有する株（例として、No. 58W株）、および変異型のG6PD遺伝子のみを有する株（例として、No. 58M株）とが得られたことが確認された。

（４）Ｌーリジン生産試験

取得したG6PD遺伝子置換株（No. 58W及びNo. 58M）及び親株であるNo. 58株のリジン生産性を5リットルジャーファーマンターにて培養、評価した。

一次種培地〔グルコース50g、酵母エキス（日本製薬社製）10g、ペプトン（極東製薬工業社製）10g、コーンステープトリカー5g、塩化ナトリウム2.5g、尿素3g、ビオチン50 μ gを水1リットルに含みpH7.2に調整し、炭酸カルシウムを10g加えた培地〕100mlに各菌株を植菌し、1リットルバッフル付き三角フラスコにて30℃で24時間培養した。次に二次種培地（グルコース50g、コーンステープトリカー10g、硫酸マグネシウム7水和物0.5g、ニコチン酸5mg、チアミン塩酸塩1mg、ビオチン100 μ g、パントテン酸カルシウム10mg、リン酸二水素一カリウム2g、尿素3g、硫酸第一鉄7水和物10mg、硫酸亜鉛7水和物1mg、硫酸アンモニウム8g、ペプトン20g、炭酸水素ナトリウム2gを水1Lに含む培地）2000mlに一次種培養液を40ml植菌し、5リットルジャーファーマンターにて30℃で12時間培養した。次に本培養培地〔廃糖蜜93g（糖換算量）、リン酸二水素一カリウム0.5g、硫酸第一鉄7水和物10mg、チアミン塩酸塩100 μ g、ソイペプトン2g、硫酸マグネシウム7水和物0.5g、ニコチン酸5mg、硫酸アンモニウム15gを水1リットルに含みpH7.4に調整した培地〕1675mlに二次種培養液を230ml植菌し、5リットルジャーファーマンターにて35℃で42時間培養した。

本培養培地中に蓄積したＬーリジンの定量は、高速液体クロマトグラフィー（HPLC）により行なった。

第1表は、No. 58株、No. 58W株、およびNo. 58M株のＬーリジン発酵生産量の測定結果である。これにより、新規の変異型G6PDにより、Ｌーリ

ジン生産性が向上することが示された。

【表1】

第1表

菌株	L-リジン生産性(g/l)
No. 58	49. 7
No. 58W	53. 5
No. 58M	63. 3

産業上の利用可能性

本発明により、改変されたG 6 P Dおよび該G 6 P D HをコードするDNAが得られ、該改変されたG 6 P Dを用いて、微生物によるL-アミノ酸の生産性を向上させることができる。

【配列表フリーテキスト】

配列番号 3 : 人工配列の説明ー合成DNA
配列番号 4 : 人工配列の説明ー合成DNA
配列番号 5 : 人工配列の説明ー合成DNA
配列番号 6 : 人工配列の説明ー合成DNA
配列番号 7 : 人工配列の説明ー合成DNA
配列番号 8 : 人工配列の説明ー合成DNA
配列番号 9 : 人工配列の説明ー合成DNA
配列番号 10 : 人工配列の説明ー合成DNA

請求の範囲

1. 配列番号2で表されるアミノ酸配列を有するポリペプチド。
2. 配列番号2で表されるアミノ酸配列において、213番目のAlaが別のアミノ酸に置換されたアミノ酸配列を有し、かつグルコース-6-リン酸デヒドロゲナーゼ活性を有するポリペプチド。
3. 配列番号12で表されるアミノ酸配列を有するポリペプチド。
4. 請求項2記載のポリペプチドのアミノ酸配列において、213番目以外の1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつグルコース-6-リン酸デヒドロゲナーゼ活性を有するポリペプチド。
5. 配列番号12で表されるアミノ酸配列において、213番目以外の1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつグルコース-6-リン酸デヒドロゲナーゼ活性を有するポリペプチド。
6. 請求項1～5いずれか1項に記載のポリペプチドをコードするDNA。
7. 配列番号1で表される塩基配列を有するDNA。
8. 配列番号1で表される塩基配列において、Alaをコードする第637～639番目の塩基配列が、Ala以外のアミノ酸をコードするコドンに置換された塩基配列を有するDNA。
9. 配列番号11で表される塩基配列を有するDNA。
10. 配列番号1で表される塩基配列を有するDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、配列番号1で表される塩基配列においてAlaをコードする第637～639番目の塩基配列に相応する塩基配列がAla以外のアミノ酸をコードするコドンに置換された塩基配列を有し、かつグルコース-6-リン酸デヒドロゲナーゼ活性を有するポリペプチドをコードするDNA。
11. 配列番号1で表される塩基配列を有するDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、配列番号1において第637番目の塩基に相応する塩基がアデニンである塩基配列を有し、かつグルコース-6-リン酸デヒドロゲナーゼ活性を有するポリペプチドをコードするDNA。
12. 請求項6～11いずれか1項に記載のDNAをベクターに組み込んで得

られる組換え体DNA。

13. 組換え体DNAが、エシェリヒア属またはコリネバクテリウム属に属する微生物で複製可能な組換え体DNAである、請求項12記載の組換え体DNA。

14. Escherichia coli TOP10 (FERM BP-7135) 株が保有するプラスミド pCRBzwfM。

15. 請求項12～14いずれか1項に記載の組換え体DNAまたはプラスミドを宿主細胞に導入して得られる形質転換体。

16. 宿主細胞が、L-アミノ酸を生産する能力を有する微生物である請求項15記載の形質転換体。

17. 宿主細胞が、エシェリヒア属またはコリネバクテリウム属に属する微生物である、請求項16記載の形質転換体。

18. 請求項6～11いずれか1項に記載のDNAを人為的に染色体上に取り込んだ、エシェリヒア属またはコリネバクテリウム属に属する形質転換体。

19. コリネバクテリウム属に属する微生物が、コリネバクテリウム・グルタミカムである、請求項17または18記載の形質転換体。

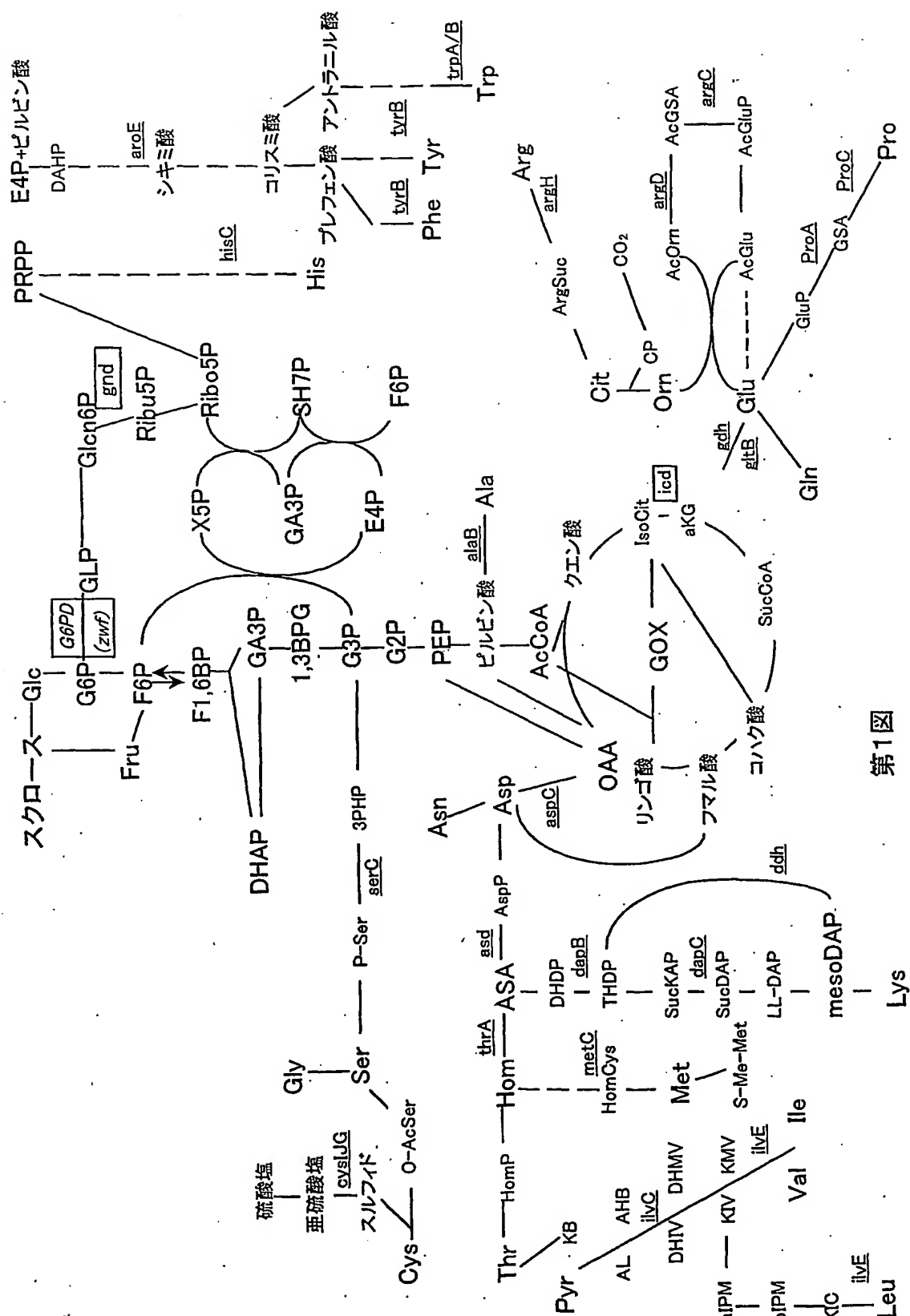
20. 請求項15～19いずれか1項に記載の形質転換体を培地に培養し、培養物中に請求項1～5いずれか1項に記載のポリペプチドを生成蓄積させ、該培養物から該ポリペプチドを採取することを特徴とする、ポリペプチドの製造方法。

21. 請求項16～19いずれか1項に記載の形質転換体を培地に培養し、培養物中にNADPHを利用して生合成されるL-アミノ酸を生成蓄積させ、該培養物から該L-アミノ酸を採取することを特徴とする、L-アミノ酸の製造方法。

22. NADPHを利用して生合成されるL-アミノ酸が、L-リジン、L-スレオニン、L-イソロイシン、L-トリプトファン、L-フェニルアラニン、L-チロシン、L-ヒスチジン、L-システインからなる群より選ばれるL-アミノ酸である、請求項21記載のL-アミノ酸の製造方法。

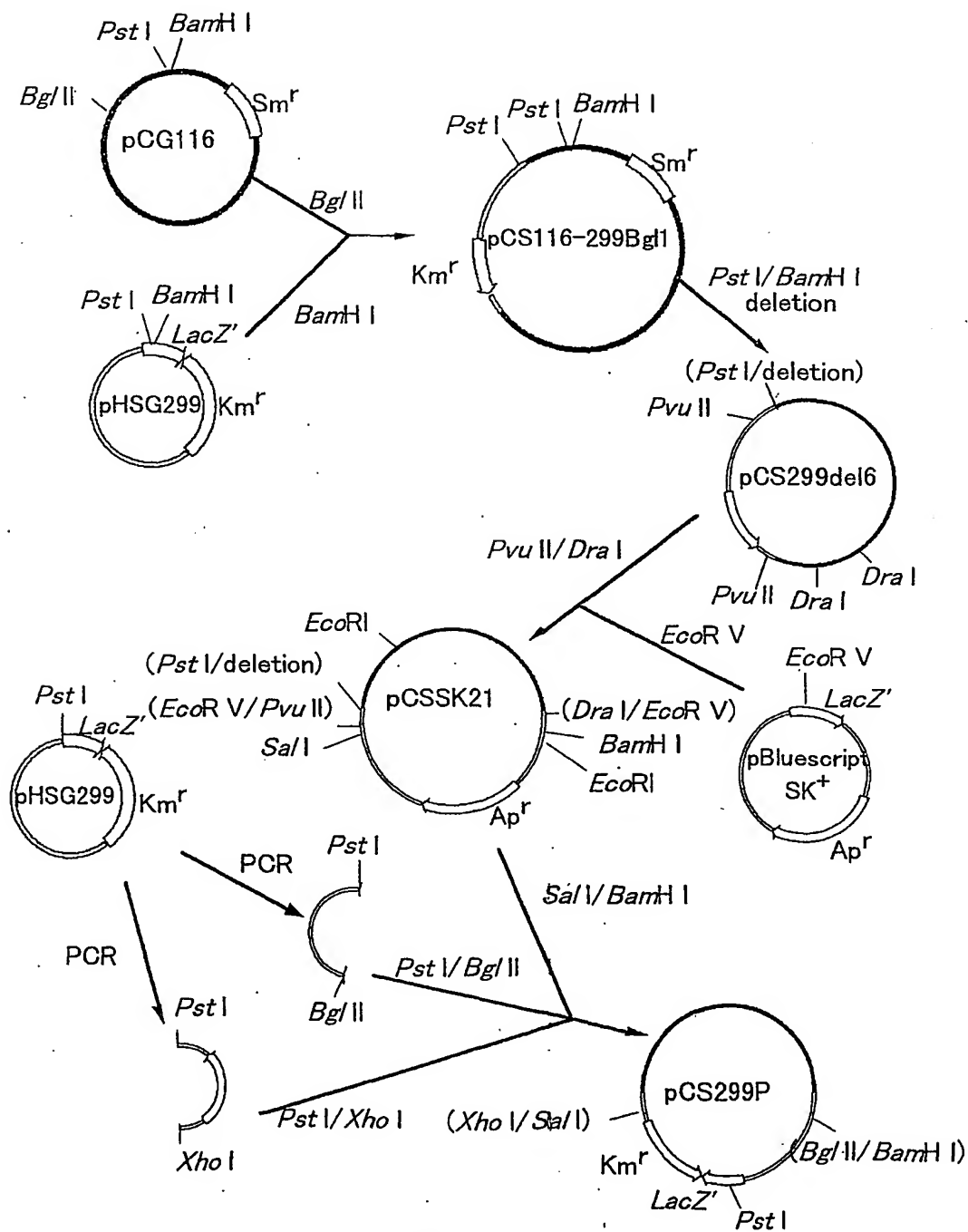
23. L-アミノ酸がL-リジンである、請求項21記載のL-アミノ酸の製造方法。

1/2



差替え用紙(規則26)

2/2



第2図

1/13

SEQUENCE LISTING

<110> Kyowa Hakko Kogyo, Co., LTD

<120> Novel Glucose-6-phosphohate Dehydrogenase

<130> 11308W01

<150> JP 2000/185789

<151> 2000-06-21

<160> 12

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 1452

<212> DNA

<213> Corynebacterium glutamicum

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(1452)

<400> 1

atg	gtg	atc	ttc	ggt	gtc	act	ggc	gac	ttg	gct	cga	aag	aag	ctg	etc	48
Met	Val	Ile	Phe	Gly	Val	Thr	Gly	Asp	Leu	Ala	Arg	Lys	Lys	Leu	Leu	
1				5					10					15		

ccc	gcc	att	tat	gat	cta	gca	aac	cgc	gga	ttg	ctg	ccc	cca	gga	ttc	96
Pro	Ala	Ile	Tyr	Asp	Leu	Ala	Asn	Arg	Gly	Leu	Leu	Pro	Pro	Gly	Phe	
		20						25					30			

tcg	ttg	gta	ggt	tac	ggc	cgc	cgc	gaa	tgg	tcc	aaa	gaa	gac	ttt	gaa	144
Ser	Leu	Val	Gly	Tyr	Gly	Arg	Arg	Glu	Trp	Ser	Lys	Glu	Asp	Phe	Glu	
		35				40					45					

aaa	tac	gta	cgc	gat	gcc	gca	agt	gct	ggt	gct	cgt	acg	gaa	ttc	cgt	192
Lys	Tyr	Val	Arg	Asp	Ala	Ala	Ser	Ala	Gly	Ala	Arg	Thr	Glu	Phe	Arg	
		50				55					60					

gaa	aat	gtt	tgg	gag	cgc	ctc	gcc	gag	ggt	atg	gaa	ttt	gtt	cgc	ggc	240
-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----

3/13

cag ctc ttg gct ctg gtt gcc atg gaa gaa cca att tct ttc gtg cca	768
Gln Leu Leu Ala Leu Val Ala Met Glu Glu Pro Ile Ser Phe Val Pro	
245 250 255	
gcg cag ctg cag gca gaa aag atc aag gtg ctc tct gcg aca aag ccg	816
Ala Gln Leu Gln Ala Glu Lys Ile Lys Val Leu Ser Ala Thr Lys Pro	
260 265 270	
tgc tac cca ttg gat aaa acc tcc gct cgt ggt cag tac gct gcc ggt	864
Cys Tyr Pro Leu Asp Lys Thr Ser Ala Arg Gly Gln Tyr Ala Ala Gly	
275 280 285	
tgg cag ggc tct gag tta gtc aag gga ctt cgc gaa gaa gat ggc ttc	912
Trp Gln Gly Ser Glu Leu Val Lys Gly Leu Arg Glu Glu Asp Gly Phe	
290 295 300	
aac cct gag tcc acc act gag act ttt gcg gct tgt acc tta gag atc	960
Asn Pro Glu Ser Thr Thr Glu Thr Phe Ala Ala Cys Thr Leu Glu Ile	
305 310 315 320	
acg tct cgt cgc tgg gct ggt gtg ccg ttc tac ctg cgc acc ggt aag	1008
Thr Ser Arg Arg Trp Ala Gly Val Pro Phe Tyr Leu Arg Thr Gly Lys	
325 330 335	
cgt ctt ggt cgc cgt gtt act gag att gcc gtg gtg ttt aaa gac gca	1056
Arg Leu Gly Arg Arg Val Thr Glu Ile Ala Val Val Phe Lys Asp Ala	
340 345 350	
cca cac cag cct ttc gac ggc gac atg act gta tcc ctt ggc caa aac	1104
Pro His Gln Pro Phe Asp Gly Asp Met Thr Val Ser Leu Gly Gln Asn	
355 360 365	
gcc atc gtg att cgc gtg cag cct gat gaa ggt gtg ctc atc cgc ttc	1152
Ala Ile Val Ile Arg Val Gln Pro Asp Glu Gly Val Leu Ile Arg Phe	
370 375 380	
ggt tcc aag gtt cca ggt tct gcc atg gaa gtc cgt gac gtc aac atg	1200
Gly Ser Lys Val Pro Gly Ser Ala Met Glu Val Arg Asp Val Asn Met	
385 390 395 400	
gac ttc tcc tac tca gaa tcc ttc act gaa gaa tca cct gaa gca tac	1248
Asp Phe Ser Tyr Ser Glu Ser Phe Thr Glu Glu Ser Pro Glu Ala Tyr	
405 410 415	

4/13

gag cgc ctc att ttg gat gcg ctg tta gat gaa tcc agc ctc ttc cct 1296
 Glu Arg Leu Ile Leu Asp Ala Leu Leu Asp Glu Ser Ser Leu Phe Pro
 420 425 430

acc aac gag gaa gtg gaa ctg agc tgg aag att ctg gat cca att ctt 1344
 Thr Asn Glu Glu Val Glu Leu Ser Trp Lys Ile Leu Asp Pro Ile Leu
 435 440 445

gaa gca tgg gat gcc gat gga gaa cca gag gat tac cca gcg ggt acg 1392
 Glu Ala Trp Asp Ala Asp Gly Glu Pro Glu Asp Tyr Pro Ala Gly Thr
 450 455 460

tgg ggt cca aag agc gct gat gaa atg ctt tcc cgc aac ggt cac acc 1440
 Trp Gly Pro Lys Ser Ala Asp Glu Met Leu Ser Arg Asn Gly His Thr
 465 470 475 480

tgg cgc agg cca 1452
 Trp Arg Arg Pro

<210> 2

<211> 484

<212> PRT

<213> *Corynebacterium glutamicum*

<400> 2

Met Val Ile Phe Gly Val Thr Gly Asp Leu Ala Arg Lys Lys Leu Leu
 1 5 10 15
 Pro Ala Ile Tyr Asp Leu Ala Asn Arg Gly Leu Leu Pro Pro Gly Phe
 20 25 30
 Ser Leu Val Gly Tyr Gly Arg Arg Glu Trp Ser Lys Glu Asp Phe Glu
 35 40 45
 Lys Tyr Val Arg Asp Ala Ala Ser Ala Gly Ala Arg Thr Glu Phe Arg
 50 55 60
 Glu Asn Val Trp Glu Arg Leu Ala Glu Gly Met Glu Phe Val Arg Gly
 65 70 75 80

Asn Phe Asp Asp Asp Ala Ala Phe Asp Asn Leu Ala Ala Thr Leu Lys
 85 90 95
 Arg Ile Asp Lys Thr Arg Gly Thr Ala Gly Asn Trp Ala Tyr Tyr Leu
 100 105 110
 Ser Ile Pro Pro Asp Ser Phe Thr Ala Val Cys His Gln Leu Glu Arg
 115 120 125

5/13

Ser Gly Met Ala Glu Ser Thr Glu Glu Ala Trp Arg Arg Val Ile Ile
 130 135 140
 Glu Lys Pro Phe Gly His Asn Leu Glu Ser Ala His Glu Leu Asn Gln
 145 150 155 160
 Leu Val Asn Ala Val Phe Pro Glu Ser Ser Val Phe Arg Ile Asp His
 165 170 175
 Tyr Leu Gly Lys Glu Thr Val Gln Asn Ile Leu Ala Leu Arg Phe Ala
 180 185 190
 Asn Gln Leu Phe Glu Pro Leu Trp Asn Ser Asn Tyr Val Asp His Val
 195 200 205
 Gln Ile Thr Met Ala Glu Asp Ile Gly Leu Gly Gly Arg Ala Gly Tyr
 210 215 220
 Tyr Asp Gly Ile Gly Ala Ala Arg Asp Val Ile Gln Asn His Leu Ile
 225 230 235 240
 Gln Leu Leu Ala Leu Val Ala Met Glu Glu Pro Ile Ser Phe Val Pro
 245 250 255
 Ala Gln Leu Gln Ala Glu Lys Ile Lys Val Leu Ser Ala Thr Lys Pro
 260 265 270
 Cys Tyr Pro Leu Asp Lys Thr Ser Ala Arg Gly Gln Tyr Ala Ala Gly
 275 280 285
 Trp Gln Gly Ser Glu Leu Val Lys Gly Leu Arg Glu Glu Asp Gly Phe
 290 295 300
 Asn Pro Glu Ser Thr Thr Glu Thr Phe Ala Ala Cys Thr Leu Glu Ile
 305 310 315 320
 Thr Ser Arg Arg Trp Ala Gly Val Pro Phe Tyr Leu Arg Thr Gly Lys
 325 330 335
 Arg Leu Gly Arg Arg Val Thr Glu Ile Ala Val Val Phe Lys Asp Ala
 340 345 350
 Pro His Gln Pro Phe Asp Gly Asp Met Thr Val Ser Leu Gly Gln Asn
 355 360 365
 Ala Ile Val Ile Arg Val Gln Pro Asp Glu Gly Val Leu Ile Arg Phe
 370 375 380
 Gly Ser Lys Val Pro Gly Ser Ala Met Glu Val Arg Asp Val Asn Met
 385 390 395 400
 Asp Phe Ser Tyr Ser Glu Ser Phe Thr Glu Glu Ser Pro Glu Ala Tyr
 405 410 415
 Glu Arg Leu Ile Leu Asp Ala Leu Leu Asp Glu Ser Ser Leu Phe Pro
 420 425 430
 Thr Asn Glu Glu Val Glu Leu Ser Trp Lys Ile Leu Asp Pro Ile Leu

6/13

				435				440				445			
Glu	Ala	Trp	Asp	Ala	Asp	Gly	Glu	Pro	Glu	Asp	Tyr	Pro	Ala	Gly	Thr
450				455				460							
Trp	Gly	Pro	Lys	Ser	Ala	Asp	Glu	Met	Leu	Ser	Arg	Asn	Gly	His	Thr
465				470				475				480			

Trp Arg Arg Pro

<210> 3
<211> 29
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: synthetic oligomer

<400> 3
gatccgatga ggctttgget ctgcgtggc 29

<210> 4
<211> 29
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: synthetic oligomer

<400> 4
cttcattggt ggactcggtg actgcagcg 29

<210> 5
<211> 37
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: synthetic oligomer

<400> 5
aattegcggc cgctctagac tgcagcggcc ggcgatg 37

7/13

<210> 6

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: synthetic
oligomer

<400> 6

cgcggccgct gcagtctaga gcggccgcg

29

<210> 7

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence : Synthetic DNA

<400> 7

aaaaagatct cgacggatcg ttccactg

28

<210> 8

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence : Synthetic DNA

<400> 8

gtaaaacgac ggccatg

17

<210> 9

<211> 35

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence : Synthetic DNA

8/13

<400> 9
cgagtcgact cgcgagtag cacctgtcac ttttg 35

<210> 10

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

$\langle 220 \rangle$

<223> Description of Artificial Sequence : Synthetic DNA

<400> 10

tggggatccg caccaacaac tgcgatggtg gtc 33

<210> 11

<211> 1452

<212> DNA

<213> *Corynebacterium glutamicum*

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(1452)

<400> 11

atg gtg atc ttc ggt gtc act ggc gac ttg gct cga aag aag ctg ctc 48
Met Val Ile Phe Gly Val Thr Gly Asp Leu Ala Arg Lys Lys Leu Leu
1 5 10 15

ccc gcc att tat gat cta gca aac cgc gga ttg ctg ccc cca gga ttc 96
Pro Ala Ile Tyr Asp Leu Ala Asn Arg Gly Leu Leu Pro Pro Gly Phe
20 25 30

tcg ttg gta ggt tac ggc cgc cgc gaa tgg tcc aaa gaa gac ttt gaa 144
Ser Leu Val Gly Tyr Gly Arg Arg Glu Trp Ser Lys Glu Asp Phe Glu
35 40 45

aaa tac gta cgc gat gcc gca agt gct ggt gct cgt acg gaa ttc cgt 192
Lys Tyr Val Arg Asp Ala Ala Ser Ala Gly Ala Arg Thr Glu Phe Arg
50 55 60

gaa aat gtt tgg gag cgc ctc gcc gag ggt atg gaa ttt gtt cgc gcc 240
Glu Asn Val Trp Glu Arg Leu Ala Glu Gly Met Glu Phe Val Arg Gly
65 70 75 80

9/13

aac ttt gat gat gat gca gct ttc gac aac ctc gct gca aca ctc aag	288
Asn Phe Asp Asp Asp Ala Ala Phe Asp Asn Leu Ala Ala Thr Leu Lys	
85 90 95	
cgc atc gac aaa acc cgc ggc acc gcc ggc aac tgg gct tac tac ctg	336
Arg Ile Asp Lys Thr Arg Gly Thr Ala Gly Asn Trp Ala Tyr Tyr Leu	
100 105 110	
tcc att cca cca gat tcc ttc aca gcg gtc tgc cac cag ctg gag cgt	384
Ser Ile Pro Pro Asp Ser Phe Thr Ala Val Cys His Gln Leu Glu Arg	
115 120 125	
tcc ggc atg gct gaa tcc acc gaa gaa gca tgg cgc cgc gtg atc atc	432
Ser Gly Met Ala Glu Ser Thr Glu Glu Ala Trp Arg Arg Val Ile Ile	
130 135 140	
gag aag cct ttc ggc cac aac ctc gaa tcc gca cac gag ctc aac cag	480
Glu Lys Pro Phe Gly His Asn Leu Glu Ser Ala His Glu Leu Asn Gln	
145 150 155 160	
ctg gtc aac gca gtc ttc cca gaa tct tct gtg ttc cgc atc gac cac	528
Leu Val Asn Ala Val Phe Pro Glu Ser Ser Val Phe Arg Ile Asp His	
165 170 175	
tat ttg ggc aag gaa aca gtt caa aac atc ctg gct ctg cgt ttt gct	576
Tyr Leu Gly Lys Glu Thr Val Gln Asn Ile Leu Ala Leu Arg Phe Ala	
180 185 190	
aac cag ctg ttt gag cca ctg tgg aac tcc aac tac gtt gac cac gtc	624
Asn Gln Leu Phe Glu Pro Leu Trp Asn Ser Asn Tyr Val Asp His Val	
195 200 205	
cag atc acc atg act gaa gat att ggc ttg ggt gga cgt gct ggt tac	672
Gln Ile Thr Met Thr Glu Asp Ile Gly Leu Gly Gly Arg Ala Gly Tyr	
210 215 220	
tac gac ggc atc ggc gca gcc cgc gac gtc atc cag aac cac ctg atc	720
Tyr Asp Gly Ile Gly Ala Ala Arg Asp Val Ile Gln Asn His Leu Ile	
225 230 235 240	
cag ctc ttg gct ctg gtt gcc atg gaa gaa cca att tct ttc gtg cca	768
Gln Leu Leu Ala Leu Val Ala Met Glu Glu Pro Ile Ser Phe Val Pro	

10/13

245	250	255	
gcg cag ctg cag gca gaa aag atc aag gtg ctc tct gcg aca aag ccg			816
Ala Gln Leu Gln Ala Glu Lys Ile Lys Val Leu Ser Ala Thr Lys Pro			
260	265	270	
tgc tac cca ttg gat aaa acc tcc gct cgt ggt cag tac gct gcc ggt			864
Cys Tyr Pro Leu Asp Lys Thr Ser Ala Arg Gly Gln Tyr Ala Ala Gly			
275	280	285	
tgg cag ggc tct gag tta gtc aag gga ctt cgc gaa gaa gat ggc ttc			912
Trp Gln Gly Ser Glu Leu Val Lys Gly Leu Arg Glu Glu Asp Gly Phe			
290	295	300	
aac cct gag tcc acc act gag act ttt gcg gct tgt acc tta gag atc			960
Asn Pro Glu Ser Thr Thr Glu Thr Phe Ala Ala Cys Thr Leu Glu Ile			
305	310	315	320
acg tct cgt cgc tgg gct ggt gtg ccg ttc tac ctg cgc acc ggt aag			1008
Thr Ser Arg Arg Trp Ala Gly Val Pro Phe Tyr Leu Arg Thr Gly Lys			
325	330	335	
cgt ctt ggt cgc cgt gtt act gag att gcc gtg gtg ttt aaa gac gca			1056
Arg Leu Gly Arg Arg Val Thr Glu Ile Ala Val Val Phe Lys Asp Ala			
340	345	350	
cca cac cag cct ttc gac ggc gac atg act gta tcc ctt ggc caa aac			1104
Pro His Gln Pro Phe Asp Gly Asp Met Thr Val Ser Leu Gly Gln Asn			
355	360	365	
gcc atc gtg att cgc gtg cag cct gat gaa ggt gtg ctc atc cgc ttc			1152
Ala Ile Val Ile Arg Val Gln Pro Asp Glu Gly Val Leu Ile Arg Phe			
370	375	380	
ggt tcc aag gtt cca ggt tct gcc atg gaa gtc cgt gac gtc aac atg			1200
Gly Ser Lys Val Pro Gly Ser Ala Met Glu Val Arg Asp Val Asn Met			
385	390	395	400
gac ttc tcc tac tca gaa tcc ttc act gaa gaa tca cct gaa gca tac			1248
Asp Phe Ser Tyr Ser Glu Ser Phe Thr Glu Glu Ser Pro Glu Ala Tyr			
405	410	415	
gag cgc ctc att ttg gat gcg ctg tta gat gaa tcc agc ctc ttc cct			1296

11/13

Glu Arg Leu Ile Leu Asp Ala Leu Leu Asp Glu Ser Ser Leu Phe Pro
 420 425 430

acc aac gag gaa gtg gaa ctg agc tgg aag att ctg gat cca att ctt 1344
 Thr Asn Glu Glu Val Glu Leu Ser Trp Lys Ile Leu Asp Pro Ile Leu
 435 440 445

gaa gca tgg gat gcc gat gga gaa cca gag gat tac cca gcg ggt acg 1392
 Glu Ala Trp Asp Ala Asp Gly Glu Pro Glu Asp Tyr Pro Ala Gly Thr
 450 455 460

tgg ggt cca aag agc gct gat gaa atg ctt tcc cgc aac ggt cac acc 1440
 Trp Gly Pro Lys Ser Ala Asp Glu Met Leu Ser Arg Asn Gly His Thr
 465 470 475 480

tgg cgc agg cca 1452
 Trp Arg Arg Pro

<210> 12

<211> 484

<212> PRT

<213> *Corynebacterium glutamicum*

<400> 12

Met Val Ile Phe Gly Val Thr Gly Asp Leu Ala Arg Lys Lys Leu Leu
 1 5 10 15
 Pro Ala Ile Tyr Asp Leu Ala Asn Arg Gly Leu Leu Pro Pro Gly Phe
 20 25 30
 Ser Leu Val Gly Tyr Gly Arg Arg Glu Trp Ser Lys Glu Asp Phe Glu
 35 40 45
 Lys Tyr Val Arg Asp Ala Ala Ser Ala Gly Ala Arg Thr Glu Phe Arg
 50 55 60
 Glu Asn Val Trp Glu Arg Leu Ala Glu Gly Met Glu Phe Val Arg Gly
 65 70 75 80

Asn Phe Asp Asp Asp Ala Ala Phe Asp Asn Leu Ala Ala Thr Leu Lys
 85 90 95
 Arg Ile Asp Lys Thr Arg Gly Thr Ala Gly Asn Trp Ala Tyr Tyr Leu
 100 105 110
 Ser Ile Pro Pro Asp Ser Phe Thr Ala Val Cys His Gln Leu Glu Arg
 115 120 125
 Ser Gly Met Ala Glu Ser Thr Glu Glu Ala Trp Arg Arg Val Ile Ile

130					135					140					
Glu	Lys	Pro	Phe	Gly	His	Asn	Leu	Glu	Ser	Ala	His	Glu	Leu	Asn	Gln
145					150					155					160
Leu	Val	Asn	Ala	Val	Phe	Pro	Glu	Ser	Ser	Val	Phe	Arg	Ile	Asp	His
				165					170					175	
Tyr	Leu	Gly	Lys	Glu	Thr	Val	Gln	Asn	Ile	Leu	Ala	Leu	Arg	Phe	Ala
		180						185					190		
Asn	Gln	Leu	Phe	Glu	Pro	Leu	Trp	Asn	Ser	Asn	Tyr	Val	Asp	His	Val
	195						200					205			
Gln	Ile	Thr	Met	Thr	Glu	Asp	Ile	Gly	Leu	Gly	Gly	Arg	Ala	Gly	Tyr
	210					215					220				
Tyr	Asp	Gly	Ile	Gly	Ala	Ala	Arg	Asp	Val	Ile	Gln	Asn	His	Leu	Ile
225					230					235					240
Gln	Leu	Leu	Ala	Leu	Val	Ala	Met	Glu	Glu	Pro	Ile	Ser	Phe	Val	Pro
				245					250					255	
Ala	Gln	Leu	Gln	Ala	Glu	Lys	Ile	Lys	Val	Leu	Ser	Ala	Thr	Lys	Pro
		260						265					270		
Cys	Tyr	Pro	Leu	Asp	Lys	Thr	Ser	Ala	Arg	Gly	Gln	Tyr	Ala	Ala	Gly
	275						280					285			
Trp	Gln	Gly	Ser	Glu	Leu	Val	Lys	Gly	Leu	Arg	Glu	Glu	Asp	Gly	Phe
	290					295					300				
Asn	Pro	Glu	Ser	Thr	Thr	Glu	Thr	Phe	Ala	Ala	Cys	Thr	Leu	Glu	Ile
305					310					315					320
Thr	Ser	Arg	Arg	Trp	Ala	Gly	Val	Pro	Phe	Tyr	Leu	Arg	Thr	Gly	Lys
			325						330					335	
Arg	Leu	Gly	Arg	Arg	Val	Thr	Glu	Ile	Ala	Val	Val	Phe	Lys	Asp	Ala
		340					345					350			
Pro	His	Gln	Pro	Phe	Asp	Gly	Asp	Met	Thr	Val	Ser	Leu	Gly	Gln	Asn
	355					360					365				
Ala	Ile	Val	Ile	Arg	Val	Gln	Pro	Asp	Glu	Gly	Val	Leu	Ile	Arg	Phe
	370					375				380					
Gly	Ser	Lys	Val	Pro	Gly	Ser	Ala	Met	Glu	Val	Arg	Asp	Val	Asn	Met
385					390					395					400
Asp	Phe	Ser	Tyr	Ser	Glu	Ser	Phe	Thr	Glu	Glu	Ser	Pro	Glu	Ala	Tyr
			405						410					415	
Glu	Arg	Leu	Ile	Leu	Asp	Ala	Leu	Leu	Asp	Glu	Ser	Ser	Leu	Phe	Pro
		420						425					430		
Thr	Asn	Glu	Glu	Val	Glu	Leu	Ser	Trp	Lys	Ile	Leu	Asp	Pro	Ile	Leu
	435					440					445				

13/13

Glu	Ala	Trp	Asp	Ala	Asp	Gly	Glu	Pro	Glu	Asp	Tyr	Pro	Ala	Gly	Thr
	450					455					460				
Trp	Gly	Pro	Lys	Ser	Ala	Asp	Glu	Met	Leu	Ser	Arg	Asn	Gly	His	Thr
465					470					475					480


Trp Arg Arg Pro

出願人又は代理人の書類記号 1308	国際出願番号 PCT/JP 01, 05113
-----------------------	----------------------------

寄託された微生物に関する表示
(PCT規則13の2)

A. 以下に示される表示は、明細書中に言及されている微生物に関するものである。 15 頁、 3 行	
B. 寄託の表示 他の寄託が別紙に記載されている <input type="checkbox"/>	
寄託機関の名称 独立行政法人産業技術総合研究所特許生物寄託センター	
寄託機関のあて名（郵便番号及び国名を含む） 日本国茨城県つくば市東1丁目1番地1 中央第6（郵便番号305-8566）	
寄託の日付 14.04.00	受託番号 FERM BP-7134
C. 追加の表示（該当しない場合には記載しない） この情報は別紙に続いている <input type="checkbox"/>	
ヨーロッパ特許が求められているそれぞれの指定国については、寄託微生物の標本の分譲は欧州特許を付与する旨の告示が公表されるまで、又は欧州特許出願が拒絶され、取下げられ若しくは取下げられたとみなされる日まで標本の請求人により指名された専門家に分譲することによってのみ可能である（Rule 28 (4) EPC）。	
D. この表示を行うための指定国（すべての指定国のために行わない場合）	
E. 追加事項の表示の提出（該当しない場合には記載しない） 下記の表示は後に国際事務局に届け出る予定である。（例えば「受託番号」のように表示事項を明記する）	

— 受理官庁記入欄 —	
<input checked="" type="checkbox"/> この用紙は国際出願とともに受理した 15.06.01	
権限のある職員	中本 節子

— 国際事務局記入欄 —	
<input type="checkbox"/> この用紙が国際事務局に受理された日 29.06.01	
権限のある職員	

出願人又は代理人の書類記号 1308	国際出願番号 PCT/JP 01/05113
-----------------------	---------------------------

寄託された微生物に関する表示
(PCT規則13の2)

A. 以下に示される表示は、明細書中に言及されている微生物に関するものである。 <div style="text-align: center;"> 17 頁、 1 行 </div>	
B. 寄託の表示 他の寄託が別紙に記載されている <input type="checkbox"/>	
寄託機関の名称 独立行政法人産業技術総合研究所特許生物寄託センター	
寄託機関のあて名 (郵便番号及び国名を含む) <div style="text-align: center;">日本国茨城県つくば市東1丁目1番地1 中央第6 (郵便番号305-8566)</div>	
寄託の日付 14.04.00	受託番号 FERM BP-7135
C. 追加の表示 (該当しない場合には記載しない) この情報は別紙に続いている <input type="checkbox"/>	
<p>ヨーロッパ特許が求められているそれぞれの指定国については、寄託微生物の標本の分譲は欧州特許を付与する旨の告示が公表されるまで、又は欧州特許出願が拒絶され、取下げられ若しくは取下げられたとみなされる日まで標本の請求人により指名された専門家に分譲することによってのみ可能である (Rule 28 (4) EPC)。</p>	
D. この表示を行うための指定国 (すべての指定国のために行わない場合)	
<p>E. 追加事項の表示の提出 (該当しない場合には記載しない)</p> <p>下記の表示は後に国際事務局に届け出る予定である。(例えば「受託番号」のように表示事項を明記する)</p>	

— 受理官庁記入欄 —	
<input checked="" type="checkbox"/> この用紙は国際出願とともに受理した <div style="text-align: center;">15.06.01</div>	
権限のある職員 <div style="text-align: center;">中本 節子</div>	

— 国際事務局記入欄 —	
<input type="checkbox"/> この用紙が国際事務局に受理された日 <div style="text-align: center;">29.06.01</div>	
権限のある職員 <div style="text-align: center;">Ole</div>	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP01/05113

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁷ C12N9/04, C12N15/53, C12N15/63, C12N1/21, C12P13/04 // (C12N9/04, C12R1:15), (C12N1/21, C12R1:19), (C12N1/21, C12R1:15)

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁷ C12N9/04, C12N15/53, C12N15/63, C12N1/21, C12P13/04

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

SwissProt/PIR/GeneSeq, Genbank/EMBL/DDBJ/GeneSeq,
WPI (DIALOG), BIOSIS (DIALOG)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
PX A	WO 01/04322 A1 (DEGUSSA AG, et al.), 18 January, 2001 (18.01.01), & EP 1109913 A1 & AU 5982100 A	1-20 21-23
PA	WO 01/00844 A2 (BASF AG), 04 January, 2001 (04.01.01), & AU 5559000 A	1-23
X A	JP 9-224661 A (Mitsubishi Chemical Corporation), 02 September, 1997 (02.09.97) (Family: none)	1-20 21-23
A	Ryoji MITSUI et al., "A Novel Operon Encoding Formaldehyde Fixation: the Ribulose Monophosphate Pathway in the Gram-Positive Facultative Methylophilic Bacterium <i>Mycobacterium gastri</i> MB19", Journal of Bacteriology, February, 2000, Vol.182, No.4, pages 944 to 948	1-23
A	S. T. COLE et al., "Deciphering the biology of <i>Mycobacterium tuberculosis</i> from the complete genome sequence", Nature, June, 1998, Vol.393, No.6685, pages 537 to 544	1-23

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:
 "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
 "E" earlier document but published on or after the international filing date
 "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
 "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
 "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
 "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
 "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
 "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
18 September, 2001 (18.09.01)

Date of mailing of the international search report
02 October, 2001 (02.10.01)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP01/05113

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	M. REDENBACH et al., "A set of ordered cosmids and a detailed genetic and physical map for the 8Mb <i>Streptomyces coelicolor</i> A3(2) chromosome", Molecular Microbiology July, 1996, Vol.21, No.1, pages 77 to 96	1-23
A	BR 9800827 A (Ajinomoto Co., Inc.), 18 May, 1999 (18.05.99), & JP 11-127869 A	1-23

国際調査報告

国際出願番号 PCT/JP01/05113

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))
 Int.Cl¹ C12N9/04, C12N15/53, C12N15/63, C12N1/21, C12P13/04
 //(C12N9/04, C12R1:15), (C12N1/21, C12R1:19),
 (C12N1/21, C12R1:15)

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl¹ C12N9/04, C12N15/53, C12N15/63, C12N1/21, C12P13/04

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

SwissProt/PIR/GeneSeq, Genbank/EMBL/DDBJ/GeneSeq,
WPI (DIALOG), BIOSIS (DIALOG)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
PX/ A	WO 01/04322 A1 (DEGUSSA AG et al) 18.1月.2001 (18.01.01) & EP 1109913 A1 & AU 5982100 A	1-20/ 21-23
PA	WO 01/00844 A2 (BASF AG) 4.1月.2001 (04.01.01) & AU 5559000 A	1-23
X/ A	JP 9-224661 A (三菱化学株式会社) 2.09月.1997 (02.09.97) ファミリーなし	1-20/ 21-23

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

18.09.01

国際調査報告の発送日

02.10.01

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

本間 夏子



4N 9637

電話番号 03-3581-1101 内線 3488

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	Ryoji MITSUI et al. A Novel Operon Encoding Formaldehyde Fixation:the Ribulose Monophosphate Pathway in the Gram-Positive Facultative Methylophilic Bacterium <i>Mycobacterium gastri</i> MB19. JOURNAL OF BACTERIOLOGY February 2000, Vol. 182, No. 4, p. 944-948	1 - 2 3
A	S.T.COLE et al. Deciphering the biology of <i>Mycobacterium tuberculosis</i> from the complete genome sequence. NATURE June 1998, Vol. 393, No. 6685, p. 537-544	1 - 2 3
A	M. REDENBACH et al. A set of ordered cosmids and a detailed genetic and physical map for the 8Mb <i>Streptomyces coelicolor</i> A3(2) chromosome. Molecular Microbiology July 1996, Vol. 21, No. 1, p. 77-96	1 - 2 3
A	BR 9800827 A (味の素株式会社) 18.5月.1999 (18.05.99) & JP 11-127869 A	1 - 2 3